

Repetibilidade de marcadores ISSR em acessos de pinhão-mansão

Sulimary Oliveira Gomes (EMBRAPA/UFPI-PPGA, sgomes_pi@hotmail.com), Raul Ferreira de Miranda Mendes (EMBRAPA/UESPI, raul-mendes@hotmail.com), Paulo Sarmanho da Costa Lima (PESQUISADOR/EMBRAPA MEIO-NORTE, sarmanho@cpamn.embrapa.com.br)

Palavras Chave: *Jatropha curcas* L., biodiesel, recursos genéticos.

1 - Introdução

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é um arbusto da família Euphorbiaceae. Esta espécie oleaginosa de ciclo perene possui como características, a fácil propagação e a boa adaptação em diferentes condições climáticas e em vários tipos de solo (Saturnino et al., 2005). No Brasil, o pinhão-mansão representa uma fonte alternativa para a produção de biodiesel, pelo seu potencial produtivo e alto rendimento teórico de óleo, o que tem motivado a formação de bancos de germoplasma e a caracterização molecular dos acessos componentes com finalidade da conservação, conhecimento e uso da variabilidade genética em programas de melhoramento.

Diversos marcadores baseados em DNA têm sido utilizados em estudos de caracterização molecular. Dentre esses, os de seqüências simples repetidas internas (ISSR) que são empregados em estudo de caracterização de espécie com importância econômica (Almeida et al., 2009), devido às vantagens de ser uma técnica simples, eficiente e possuir altos índices de polimorfismo (Reddy et al., 2002), além de apresentar custo relativamente reduzido, quando comparado a outros marcadores moleculares.

Contudo, devem-se estabelecer cuidados quanto à padronização das condições de amplificação com marcadores ISSR, tais como: preparo da solução, concentração dos reagentes usados na reação, pipetagem, qualidade dos reagentes e efeito da variação entre termocicladores. Esses procedimentos podem aumentar o índice de repetibilidade dos resultados dos ensaios. Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a repetibilidade de marcadores ISSR em acessos de pinhão-mansão.

2 - Material e Métodos

Foram usados DNA dos acessos CMN 325, CMN 327, NP e J de pinhão-mansão, pertencente ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte.

As reações foram realizadas com os primers UBC 813, UBC 845 e UBC 864, cuja temperatura de anelamento foi determinada em 48°C. Foram repetidas três reações de amplificação no mesmo termociclador, mantendo-se a composição dos reagentes, visando assegurar melhor precisão dos resultados.

O volume final da solução utilizado nas reações foi de 20 µL, contendo os seguintes componentes: tampão

1,5x [30 mM de Tris-HCl; 75 mM KCl] (Cenbiont), 2,5 mM de MgCl₂ (Cenbiont), 0,8 mM de dNTP, 0,25 µM de primer, 1U de Taq DNA Polimerase (Ludwig), 1 µL de DNA genômico (7 ng) e água ultrapura.

As reações foram preparadas em tubos de 0,2 mL, sendo realizadas em termociclador Veriti™ 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), com uma fase inicial de desnaturação de 1,5 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de 40 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 48°C para anelamento, 2 minutos a 72°C para extensão e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos das reações foram separados em gel de agarose a 1,5% conduzido a 80 V por 4,5 horas.

O gel foi corado com GelRed™ 10.000X (Uniscience) e fotodocumentado sob luz ultravioleta. A partir das fotografias dos géis realizou-se uma avaliação visual, determinando o número de bandas produzidas pelos primers. Neste estudo, foram consideradas apenas as bandas de maior intensidade e localizadas entre 2500 pb (pares de bases) e 300 pb.

A codificação dos locos foi feita pela presença e ausência dos fragmentos amplificados, sendo os géis comparados quanto à repetição das bandas em cada acesso e para cada primer.

3 - Resultados e Discussão

A repetibilidade das amplificações por ISSR foi verificada em todos os primers e nos diferentes acessos (Tabela 1). Desse modo, a confiabilidade dos dados foi constatada pelas repetições das reações e das bandas geradas nos três géis analisados.

Tabela 1. Repetibilidade dos marcadores ISSR em acessos de pinhão-mansão.

Acessos	Repetibilidade (%)		
	UBC 813 ¹	UBC 845 ¹	UBC 864 ¹
CMN 325	85,2	83,4	90,0
CMN 327	83,4	91,7	90,0
Nova Porteira	80,0	84,5	90,0
Janaúba	83,4	91,7	90,0

¹Primers desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canadá.

Destacou-se o primer UBC 864 em que apresentou índice de repetibilidade de 90% dos locos ISSR gerados. Ramos et al., (2008) observaram índice de repetibilidade

igual a 84% em seu estudo com RAPD. Estima-se que o marcador ISSR apresenta 92 a 95% de repetibilidade, isso ocorre provavelmente devido ao uso de *primers* longos (16–25 pb) quando comparado com *primers* de outros tipos de marcadores moleculares (Reddy et al., 2002), como o RAPD.

A análise de repetibilidade dos locos permitiu verificar que existe uma menor repetibilidade nos locos cujo tamanho dos fragmentos são inferiores a 650 pb, sendo que o comprimento dos fragmentos obtidos variou de 600 a 2036 pb. Normalmente os produtos amplificados pelos marcadores ISSR variam de 200-2000 pb (Reddy et al., 2002). Um exemplo do padrão obtido para cada acesso com os *primers* estudados está apresentado na Figura 1.

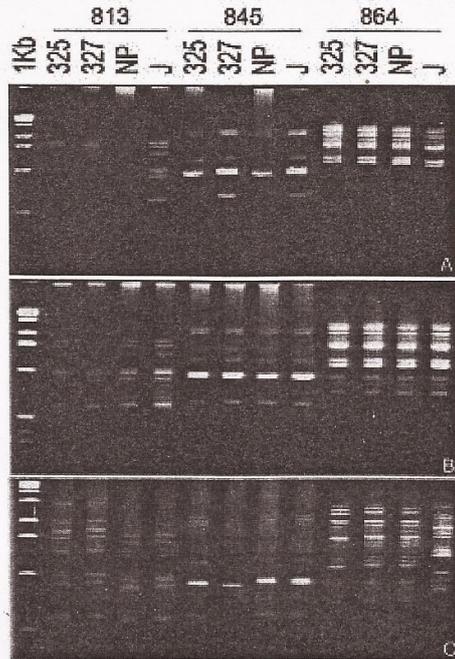


Figura 1. Fragmentos ISSR amplificados em acessos de pinhão-mansô. A, B e C – repetições dos géis de agarose.

Os índices de repetibilidade mostrados neste trabalho confirmam que quando padronizadas as condições de PCR, pode-se obter uma boa taxa de repetibilidade dos locos ISSR, garantindo o uso dessa técnica como uma importante ferramenta em estudos moleculares. Desse modo, esses resultados sugerem que a técnica de ISSR, quando bem padronizada, permite a obtenção de resultados confiáveis, uma vez que a taxa de repetibilidade dos locos que variou de 83% a 90% foi relativamente alta.

A FINEP, Petrobras/ Projeto Fontes Alternativas, e ao PAC/Embrapa pelo suporte financeiro.

5 - Bibliografia

- ¹ ALMEIDA, C. M. A. de.; LIMA, S. E. N. de.; LIMA, G. S. A.; BRITO, J. Z. de.; DONATO, V. M. T. S.; SILVA, M. V. da. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. *Ciência e Agrotecnologia*. [online], v. 33, n.spe, p. 1771-1776, 2009.
- ² PINTO, A. C. Q.; ROSSETTO, C. J.; FALEIRO, F. G. Melhoramento genético da manga no Brasil. In: I Simpósio de Manga do Vale do São Francisco. Petrolina - PE: Embrapa Cpatsa, v. 1, 2005.
- ³ RAMOS, J. R.; TELLES, M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; SOARES, T. N.; MELO, D. B.; OLIVEIRA, G. Optimizing reproducibility evaluation for random amplified polymorphic DNA markers. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, n. 4, p. 1384 -1391, 2008.
- ⁴ REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, Dordrecht, v. 128, p. 9-17, 2002.
- ⁵ SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; NAGASHI, T.; GONÇALVES, N. P. *Cultura do pinhão-mansô (Jatropha curcas L.)* Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.26, n. 229, p.44-78, 2005.
- ⁶ WALKER, M. R.; RAPLEY, R. *Guia de rotas na tecnologia do gene*. São Paulo: Atheneu Editora, 1999, p.334.

4 - Agradecimentos

SALVADOR - BAHIA
16 a 19 DE ABRIL DE 2012